



27 SEP 2004

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">A61K 31/00</p>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/40905 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. August 1999 (19.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00730 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Februar 1999 (04.02.99) (30) Prioritätsdaten: 198 05 946.9 13. Februar 1998 (13.02.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DR. WILLMAR SCHWABE GMBH & CO. [DE/DE]; Willmar-Schwabe-Strasse 4, D-76227 Karlsruhe (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CHATTERJEE, Shyam, Sunder [DE/DE]; Stettiner Strasse 1, D-76139 Karlsruhe (DE). ERDELMEIER, Clemens [DE/DE]; Glogauer Strasse 32, D-76139 Karlsruhe (DE). NÖLDNER, Michael [DE/DE]; Neuheckstrasse 3, D-76139 Karlsruhe (DE). (74) Anwalt: BUNKE, Holger, Prinz & Partner, Manzingerweg 7, D-81241 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, DE, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: USE OF HYPERFORIN AND HYPERFORIN-CONTAINING EXTRACTS IN THE TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF DEMENTING DISEASES (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON HYPERFORIN UND HYPERFORINHALTIGEN EXTRAKTEN ZUR BEHANDLUNG UND PROPHYLAXE VON DEMENZERKRANKUNGEN (57) Abstract The invention relates to the use of hyperforin and hyperforin-containing extracts of <i>Hypericum perforatum</i> L. (St. John's wort) in the treatment and prophylaxis of dementing diseases, including Alzheimer's disease. The invention also relates to the use of hyperforin and hyperforin-containing extracts for producing a medicine for the treatment and prophylaxis of such dementing diseases. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft die Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten aus <i>Hypericum perforatum</i> L. (Johanniskraut) bei der Behandlung und Prophylaxe von Demenzerkrankungen, einschließlich der Alzheimer-Krankheit, sowie die Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und Prophylaxe solcher Demenzerkrankungen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

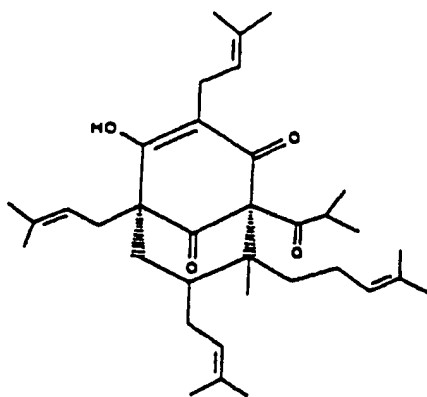
WO 99/40905

PCT/EP99/00730

Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen
Extrakten zur Behandlung und Prophylaxe von
Demenzerkrankungen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten aus Hypericum perforatum L. (Johanniskraut) bei der Behandlung und Prophylaxe von Demenzerkrankungen wie zum Beispiel der Alzheimer-Krankheit.

Das Phloroglucinderivat Hyperforin der folgenden
Strukturformel



Hyperforin

ist einer der Hauptinhaltsstoffe des Johanniskrauts. Da die Substanz chemisch instabil ist, nimmt ihr Gehalt schon bei der Trocknung der Frischpflanze ab. Bei schneller Trocknung und unter schonenden Bedingungen findet man Hyperforin in der Johanniskraut-Droge noch in hoher Konzentration, die dem Gehalt frischer Pflanzen vergleichbar ist.

Hypericum-Extrakte werden seit vielen Jahren zur Behandlung von Depressionen und psychovegetativen Störungen verwendet (vgl. Linde et al., BMJ, Vol. 313, S. 253-258, (1996)). In der DE-PS 196 19 512 ist ein Verfahren zur Herstellung von Hypericum-Extrakten beschrieben, die einen stabilen

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

- 2 -

Aus EP-A-0 599 307 sind Hypericum-Trockenextrakte und Verfahren zu ihrer Herstellung bekannt, die arm an Hypericin sind, aber einen höheren Gehalt an Hyperforin haben als das pflanzliche Ausgangsmaterial. Diese Extrakte besitzen eine stark Serotonin-antagonistische Wirkung, und sie werden zur Herstellung psychovegetativ und antidepressiv wirksamer Arzneimittel verwendet. Diese Extrakte werden zur Behandlung von Angsterkrankungen, nervöser Agitiertheit, Migräne, gastrointestinalen Störungen und Erbrechen verwendet. Darüber hinaus sind für verschiedene Zubereitungen, die einen Hypericum-Extrakt allein oder in Kombination mit anderen Stoffen enthalten, eine Vielzahl von Anwendungen im medizinischen und kosmetischen Bereich beschrieben. Bekannt sind insbesondere auch antivirale und antibakterielle Effekte. So ist aus WO 97/22354 die Verwendung von Hypericum-Extrakten zur Behandlung viraler Erkrankungen, insbesondere von HIV, bekannt, während in der russischen Patentschrift RU-C1-2 031 645 antibakterielle Effekte und die Anwendung von Hypericum-Extrakt enthaltenden Salben zur Verhinderung von beim Geschlechtsverkehr übertragbaren Krankheiten beschrieben sind.

In tierexperimentellen Untersuchungen wurde nun überraschenderweise eine signifikante Beeinflussung kognitiver Funktionen durch Hyperforin und hyperforinhaltige Extrakte aus Hypericum perforatum L. gefunden. Eine derartige Wirkung ist bisher weder für Hyperforin noch für hyperforinhaltige Extrakte beschrieben worden und war aufgrund der bisher bekannten pharmakologischen und klinischen Effekte auch nicht zu erwarten. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde erstmalig eine Beeinflussung der Gedächtnisleistung durch einen hyperforinreichen Hypericum-Extrakt und durch Hyperforin selbst gefunden. Hyperforin und hyperforinhaltige Extrakte können somit für die Therapie von neurologischen Erkrankungen, die mit Demenz einhergehen, eingesetzt werden.

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

- 3 -

Unter Demenz versteht man eine entscheidende Abnahme der intellektuellen Leistungsfähigkeit, die als Abnahme des Gedächtnisses und des Denkvermögens in Erscheinung tritt und mit einer Beeinträchtigung der persönlichen Aktivitäten des täglichen Lebens verbunden ist. Große Autopsie-Statistiken und klinisch-epidemiologische Untersuchungen zeigen, daß neurodegenerative Erkrankungen mit ca. 60% die häufigste Ursache einer Demenz sind. Danach folgen mit ca. 20% der Fälle die sogenannten vaskulären Demenzformen und mit weiteren ca. 20% andere Ursachen (vgl. Rösler et. al., Fortschr. Med. 114, S. 351-356 (1996)). Bis heute existiert keine allgemein anerkannte Therapiemethode für demenzielle Erkrankungen, so daß sich die Behandlung auf die Verbesserung der klinischen Symptome beschränken muß.

Die Alzheimer-Demenz oder Alzheimer-Krankheit ist eine schleichend beginnende Krankheit, die gekennzeichnet ist durch anfängliche Vergeßlichkeit, zunehmende Gedächtnisstörungen und Einbußen weiterer kognitiver Fähigkeiten. Sie endet mit dem völligen geistigen Verfall und Persönlichkeitsverlust der Patienten. Eine befriedigende kausalerorientierte Therapie dieser Krankheit steht bisher nicht zur Verfügung (vgl. K. Mendla, "Die Alzheimer-Krankheit: Neue Ansätze in der Pharmakotherapie", Pharm. Zeitung 141, S. 351-356 (1996)). Behandelt wird die Alzheimer-Demenz mit Acetylcholinesterase-Hemmstoffen, um die Menge des im Gehirn verfügbaren Acetylcholins zu erhöhen. Diese Behandlung führt zu einer Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen, die keine dauerhafte Therapie zulassen (vgl. Shvaloff et al., Psychopharmacology Bulletin, Vol. 32, S. 343-352 (1996)).

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, antidementiell wirkende Substanzen und solche Substanzen enthaltende Zusammensetzungen bereitzustellen, die weniger Nebenwirkungen haben als die bisher für die diese Indikation verwendeten Arzneimittel.

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

- 4 -

Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten aus Hypericum perforatum L. (Johanniskraut) bei der Behandlung und Prophylaxe von Demenzerkrankungen, einschließlich der Alzheimer-Krankheit, der vaskulären Demenz und von Mischformen der Demenz, und damit die Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten als Arzneimittel zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Störung der Gedächtnis- oder Lernleistung einhergehen, sowie die Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten des Johanniskrauts zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und Prophylaxe von Demenzerkrankungen, insbesondere der Alzheimer-Krankheit, der vaskulären Demenz und von Mischformen der Demenz.

Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden werden zu wollen, scheint die Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten einen kausaltherapeutischen Ansatzpunkt aufzuweisen, weil nämlich überraschenderweise gefunden wurde, daß Hyperforin und die genannten Extrakte potente Stimulatoren der Proteinkinase Cy sind. Diese Proteinkinase Cy aktiviert die α -Sekretase, welche wiederum die Entstehung des pathogenen Amyloids A β verhindert. Ein besonderer Vorteil von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten liegt somit darin, daß diese nicht nur gezielt die Bildung von Amyloid A β verhindern, sondern auch die bei Demenzerkrankungen, insbesondere Alzheimer, häufig auftretenden psychiatrischen Begleitsymptome wie Ängstlichkeit, Depressionen und andere psychovegetative Störungen wirksam bekämpfen können.

Ein erfindungsgemäß verwendbarer hyperforinhaltiger Extrakt wurde wie folgt gewonnen:

30 kg getrocknete, gemahlene Johanniskraut-Droge wurden in eine Hochdruckextraktionsanlage gegeben und bei 280×10^5 Pa (280 bar) und 40 °C mit Kohlendioxid extrahiert. Dabei wurden 30 kg CO₂ je Kilogramm Droge eingesetzt. Nach der

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

- 5 -

Extraktion wurde der Druck auf 60×10^5 Pa (60 bar) reduziert, wobei der Extrakt abgeschieden wurde. Der Extrakt wurde der Apparatur entnommen und durch Erhitzen auf ca. 45 °C von mitextrahiertem Wasser abgetrennt. Man erhielt 1,25 kg Extrakt mit einem Hyperforin-Gehalt von 34,5%. Zur Stabilisierung des Hyperforins wurden dem warmen Extrakt 500 mg Ascorbinsäurestearat zugegeben.

Zur Isolierung von Hyperforin aus dem so gewonnenen Extrakt wurde wie folgt vorgegangen:

31 g des nach vorstehend beschriebenem Verfahren erhaltenen Extraktes wurden unter Rühren, Stickstoffatmosphäre und Lichtschutz in 3 Liter n-Heptan, das mit Methanol gesättigt war, gelöst. Die erhaltene Extraktlösung wurde dann einmal mit 1,5 l Methanol, das mit n-Heptan gesättigt war, und dreimal mit je einem Liter des gleichen Lösungsmittels ausgeschüttelt. Die Methanolphasen wurden vereinigt und bei einer Wasserbadtemperatur von maximal 45 °C am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Im Vakuumtrockenschrank wurde über Nacht bei Raumtemperatur nachgetrocknet. Man erhielt so 20,14 g Methanolphase.

Die Gesamtmenge an Methanolphase wurde in 100 ml Methanol gelöst. Die so erhaltene Stammlösung wurde zur präparativen Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt: Sie wurde ca. 2 Minuten im Ultraschallbad entgast, in einem Braunglas unter Stickstoffatmosphäre bei - 18 °C gelagert und der präparativen HPLC unterworfen. Von der Stammlösung wurden für jede präparative HPLC-Trennung 3,7 ml verwendet, was einer Substanzmenge von 745 mg entspricht. Die Bedingungen der präparativen HPLC waren wie folgt:

Eluens:	88 Vol.-% Methanol, reinst
Detektion:	270 nm
Fluß:	90 ml/min.
Säule:	Eurospher 100-C18, 7 µm, ID 32 mm.

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

- 6 -

Der Hyperforin-Peak wurde von jeder einzelnen präparativen Trennung gesammelt. Die Hyperforin enthaltenden HPLC-Eluate wurden zunächst bei - 18 °C gelagert. Dann wurden sie vereinigt und zügig am Rotationsverdampfer bei maximal 45 °C Wasserbadtemperatur, unter Lichtschutz und Stickstoffbegasung des Vorratsgefäßes wässrig aufkonzentriert. Diese Konzentrate wurden mit Hilfe von Methanol in Braungläser umgespült und bis zur endgültigen Vereinigung bei - 18 °C unter Stickstoffatmosphäre gelagert. Nach dem Abziehen des Methanols und einer Hochvakuumtrocknung wurden 9,4 g Hyperforin erhalten, welches durch UV-, IR- und ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren charakterisiert wurde.

Als Tiermodell zum Nachweis der kognitiven Wirkung des Hyperforins und des nach dem oben beschriebenen Verfahren gewonnenen hyperforinhaltigen Extrakts wurde das sogenannte "conditioned avoidance"-Modell gewählt.

Bei diesem Modell wird ein geschlossener Kunststoffkäfig, die "conditioned avoidance box", benutzt, der in der Mitte durch eine Trennwand in zwei gleich große Kammern oder Kompartimente geteilt ist. In der Mitte der Trennwand befindet sich eine Tür, die durch eine automatische Steuerung geöffnet und geschlossen werden kann. Der Boden beider Kammern besteht aus einem elektrisch leitenden Gitterrost. An den Wänden jeder Kammer befindet sich eine Lampe und ein Lautsprecher, über die Licht- und Tonsignale abgegeben werden können.

Eine einzelne Ratte wird zum Training jeweils in das rechte Kompartiment der Box gesetzt, wobei die Tür der Trennwand geschlossen bleibt. Nachdem sich die Ratte 10 Minuten an die neue Umgebung gewöhnt hat, beginnt ein automatisiertes Programm mit dem Öffnen der Tür. Nach 20 Sekunden erscheint für 3 Sekunden ein kombiniertes Ton-Licht-Signal in der Kammer, in der sich die Ratte aufhält (conditioned stimulus). Bleibt die Ratte trotz des Stimulus in der

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

- 7 -

Kammer, folgt ein 3 Sekunden währender Stromreiz über die Gitterstäbe (unconditioned stimulus). Anschließend beginnt ein neuer Zyklus. Wechselt die Ratte vor oder während des conditioned stimulus in die gegenüberliegende Kammer, vermeidet sie den Stromreiz, und der neue Zyklus beginnt in der anderen Kammer. Insgesamt muß die Ratte 40 derartige Durchgänge am Tag absolvieren. Diese Prozedur wiederholt sich an sieben aufeinander folgenden Tagen in gleicher Art und Weise. Anschließend folgt eine Pause von 10 Tagen, in denen weder behandelt noch trainiert wird. Am 17. Versuchstag werden die Tiere ein letztes Mal in die Box gesetzt, jedoch mit dem Unterschied, daß keine Stromreize mehr appliziert werden.

Durch das tägliche Trainingsprogramm erlernen die Ratten, daß sie den Stromreiz durch Wechseln der Kompartimente vermeiden können (Vermeidungsverhalten). Substanzen, die die Lern- oder Gedächtnisfunktionen verbessern, führen zu einem schnelleren Erlernen des Vermeidungsverhaltens und dadurch zu einer geringeren Anzahl von Elektroschocks.

Tägliche orale Applikationen von 25 oder 50 mg/kg Hypericum-Extrakt sowie von 2,5 oder 5 mg/kg reinem Hyperforin führen zu einem deutlich schnelleren Erlernen des Vermeidungsverhaltens. In der beschriebenen Versuchsanordnung zeigt sich dieser Effekt in einer wesentlich höheren Anzahl korrekter Vermeidungsreaktionen während der siebentägigen Behandlungs- und Trainingsphase (vgl. Fig. 1). Das erlernte Verhalten wird von den mit Hypericum-Extrakt oder mit Hyperforin behandelten Tieren weniger schnell vergessen, was an der Reaktion der Tiere nach der zehntägigen Behandlungs- und Trainingspause am 17. Tag des Versuchs erkennbar wird (vgl. Fig. 2).

Die in Fig. 1 wiedergegebenen Graphen geben die Anzahl korrekter Wechsel der Versuchstiere von einem Kompartiment in das andere vom 1. bis zum 7. Tag und - nach zehntägiger Pause - am 17. Tag wieder, und zwar sowohl für unbehandelte

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

- 8 -

Versuchstiere als auch für Versuchstiere, die täglich 25 mg/kg bzw. 50 mg/kg Hypericum-Extrakt p.o. verabreicht bekommen haben, und solche Versuchstiere, die täglich 1,25 bzw. 2,5 mg/kg reines Hyperforin p.o. verabreicht bekommen haben. Dabei fällt auf, daß reines Hyperforin weniger wirksam ist als der Hypericum-Extrakt in einer Dosis von 50 mg/kg.

In Fig. 2 ist die Anzahl der korrekten Antworten der Versuchstiere am 17. Tag noch einmal in anderer graphischer Form dargestellt.

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

- 9 -

Patentansprüche

1. Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten aus Hypericum perforatum L. (Johanniskraut) bei der Behandlung und Prophylaxe von Demenzerkrankungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1 bei der Behandlung und Prophylaxe der Alzheimer-Krankheit.
3. Verwendung nach Anspruch 1 bei der Behandlung und Prophylaxe der vaskulären Demenz.
4. Verwendung nach Anspruch 1 bei der Behandlung und Prophylaxe von Mischformen der Demenz.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Extrakt mindestens 2 Gew.-% Hyperforin enthält.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hyperforin durch Zugabe eines Stabilisators stabilisiert ist.
7. Verwendung von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten aus Hypericum perforatum L. (Johanniskraut) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und Prophylaxe von Demenzerkrankungen, insbesondere der Alzheimer-Krankheit, der vaskulären Demenz und von Mischformen der Demenz.

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

1/2

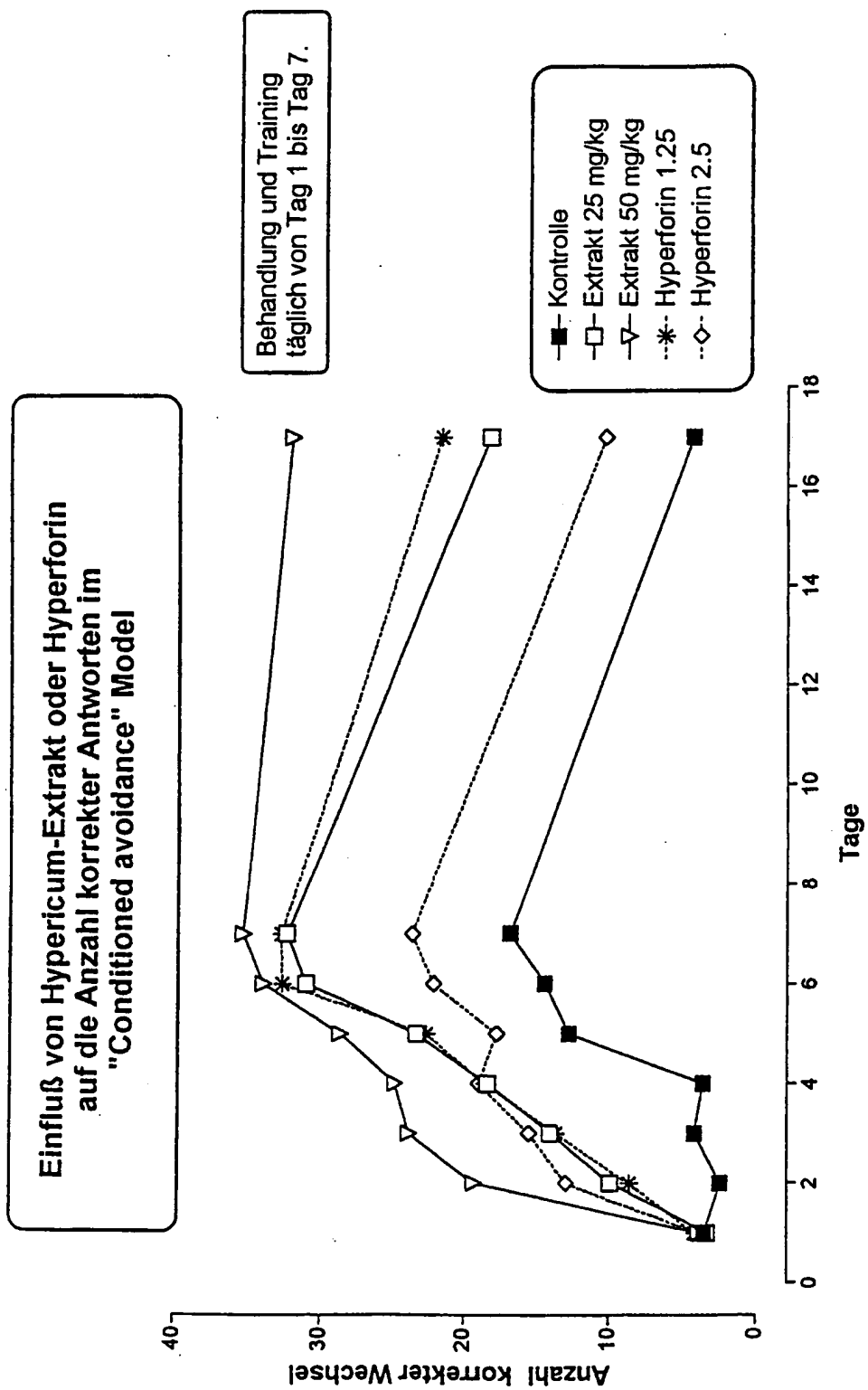


Fig. 1

WO 99/40905

PCT/EP99/00730

2/2

Einfluß von Hypericum-Extrakt oder Hyperforin
auf die Anzahl korrekter Antworten im
"Conditioned avoidance" Modell.
Am Tag 17

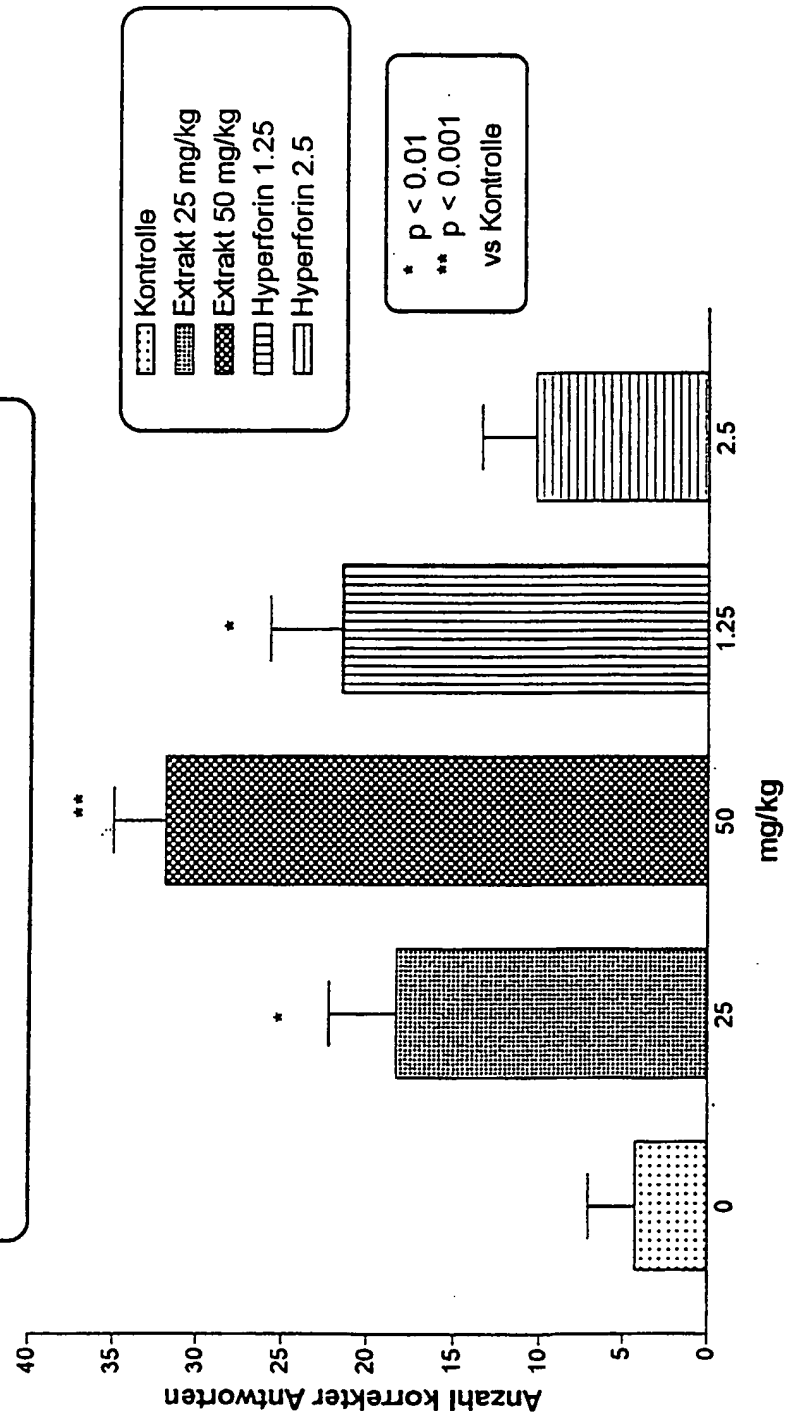


Fig. 2